

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA LAMPUGNANI

Staphylococcus COAGULASE POSITIVA EM LEITE CRU REFRIGERADO:
POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

PALOTINA
2016

CAMILA LAMPUGNANI

Staphylococcus COAGULASE POSITIVA EM DE LEITE CRU REFRIGERADO:
POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L238

Lampugnani, Camila

Staphylococcus coagulase positiva em leite cru refrigerado:
potencial enterotoxigênico e resistência a antimicrobianos/
Camila Lampugnani . - Palotina, 2016.
60f.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1 . Enterotoxinas. 2. Patógeno. 3. *Staphylococcus aureus*.
I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Universidade
Federal do Paraná.

CDU 637.133

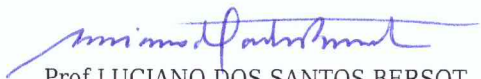



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL
Código CAPES: 40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CAMILA LAMPUGNANI**, intitulada: "**STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA EM LEITE CRU REFRIGERADO: POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Palotina, 17 de Junho de 2016.


Prof LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


Prof JOSÉ PAES DE ALMEIDA NOGUEIRA PINTO
Avaliador Externo (UNESP/BOT)


Prof SILVIA CRISTINA OSAKI
Avaliador Interno (UFPR)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Camila Lampugnani, filha de Antonio Lampugnani e Neiva dos Santos Lampugnani, natural de Palotina-PR e nascida em 08/12/1988. Possui formação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, concluída em 2011. No ano de 2012, ingressou no Programa de Residência em Medicina Veterinária da UFPR - Palotina, na área de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Em 2014, foi aprovada no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, com pesquisa voltada à microbiologia de P.O.A., e qualidade e higiene do leite.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.
Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar minha jornada até aqui, por me permitir alimentar sempre a grande fé que trago em meu ser e pelas inúmeras bênçãos em minha vida.

Aos animais por sua simples e fundamental existência. Pelos ensinamentos que oferecem a quem a alma permite aprender.

Aos meus pais, por serem os melhores! Pela amizade, carinho, suporte, ensinamentos e principalmente pelo exemplo de integridade e esforço.

Ao meu irmão, pelo companheirismo e pelas risadas compartilhadas.

Ao meu esposo, Osiris Antunes de Caxias Junior, pelo amor, amizade, cumplicidade, paciência e dedicação. Por me tornar alguém melhor. E pelo auxílio na coleta das amostras.

À Universidade Federal do Paraná pelo incontestável e sólido suporte em minha formação.

Aos funcionários e servidores desta instituição, que de uma forma ou de outra contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Em especial aos Professores: Roberto Rochadelli, pelo auxílio no contato com os produtores rurais; e Erica Cristina Bueno do Prado Guirro, Nelson Luis Melo Fernandes, Roberta Paulert pelo empréstimo de equipamentos.

Ao servidor Pedro Argel Zadinelo Moreira, pelo auxílio.

Ao Lacoma, laboratório onde aprendi e me aperfeiçoei por quatro valiosos anos e onde fiz inestimáveis amizades.

À família Lacoma: Rosana, Cibeli, Malu, Kadigia, Thiago, Kamila, Jorge e a todos os estagiários que passaram por lá, pela contribuição em meu aprendizado.

Aos meus queridos amigos Nelson, Ananiza, Heloise, Valéria, Fabiane e Mykaella, por fazerem parte da minha história e pelos ensinamentos.

Às minhas grandes amigas Ana Paula Perin e Rosangela Estel Ziech pelo auxílio, parceria, risadas e sintonia intelectual. Considero-as como irmãs!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Professor Luís Augusto Nero pela importante contribuição e aprendizado, e pelo espaço e material cedido para a pesquisa.

Aos colegas que conheci em Viçosa, em especial à Brenda, pela convivência e pelo auxílio, e por tornar os dois meses de missão nesta cidade mais amenos pela distância da família.

À minha querida amiga Maria Emilene Campos-Galvão, por sua paciência e amabilidade e por ser um exemplo de profissional, de mestre, de mãe, de amiga, enfim, de pessoa. E por sua fundamental participação neste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pela oportunidade concedida através de meu ingresso no PPGCA e pelo auxílio financeiro.

Aos Professores do PPGCA e a secretária Margarida pela contribuição.

Ao meu orientador, Luciano dos Santos Bersot, pela oportunidade e pelos ensinamentos e por ter possibilitado com isso o meu aprimoramento intelectual, profissional e pessoal.

A todos, os meus mais profundos agradecimentos e votos de que o melhor sempre aconteça em suas jornadas!

RESUMO

Staphylococcus sp. são micro-organismos comensais de pele e mucosas de humanos e animais. São importantes causadores de mastite em vacas leiteiras e desta forma estão frequentemente presentes no leite. A presença destes micro-organismos no leite, principalmente *Staphylococcus* coagulase positiva, devem ser evitadas, pois muitas espécies tem potencial de produzir enterotoxinas. Estas enterotoxinas são termorresistentes continuando ativas mesmo sendo submetidas aos tratamentos térmicos usuais de processamento do leite. Os sinais clínicos mais comuns de intoxicação estafilocócica são náuseas, vômito e diarreia e ocorrem de 2-6 horas após a ingestão da enterotoxina. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial enterotoxigênico e o perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP) isoladas de leite cru refrigerado coletado em propriedades rurais de três municípios da região oeste do Paraná. As amostras foram submetidas à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, identificação molecular da espécie e de genes de enterotoxinas clássicas, bem como sua produção *in vitro*, além de teste de suscetibilidade a antimicrobianos. Das propriedades coletadas, 50% apresentaram amostras com contagens de SCP. Foram isoladas 62 cepas de SCP e deste total, 95,2% foram confirmadas *S. aureus* através da presença do gene *nuc*. Destas, 44,1% apresentaram ao menos um gene relacionado à produção de enterotoxinas clássicas. Apenas uma cepa produziu enterotoxinas. Todas as cepas foram resistentes a ao menos um antimicrobiano. Quatro propriedades que produziam queijo a partir do leite cru apresentaram cepas de SCP enterotoxigênicas, configurando um grande risco à saúde pública.

Palavras-chave: enterotoxinas, patógeno, refrigeração, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Staphylococcus sp. is a common bacterial colonizer of the skin and mucous membranes of humans and animals. It's important cause of mastitis in dairy cows and therefore is often present in milk. The presence of these microorganisms in milk, particularly coagulase positive *Staphylococcus* (CPS), should be avoided since many species has potential to produce enterotoxins. These enterotoxins are heat resistant and remain active even being subjected to the usual heat treatment of milk processing. The most common symptoms of staphylococcal food poisoning are nausea, vomiting and diarrhea and occur 2-6 hours after ingesting the enterotoxin. The objective of this study was to investigate the potential enterotoxigenic and resistance profile of coagulase positive *Staphylococcus* strains isolated from refrigerated raw milk collected from farms in three cities in western Paraná. The samples were submitted to *Staphylococcus* coagulase positive count, molecular identification and detection of genes for classic enterotoxins, as well as their production in vitro, and antimicrobial susceptibility testing. Fifty percent of samples had count of CPS. A total of 62 CPS strains was isolated. From these, 95,2% were *S. aureus*, confirmed by the presence of the gene *nuc*, and in 44,1% was observed at least one classic enterotoxin gene. One isolated was positive for enterotoxin production. All strains were resistant to at least one antimicrobial. Four farms that made cheese with raw milk had presence of enterotoxigenic CPS, representing a public health threat.

Keywords: enterotoxins, pathogen, refrigeration, *Staphylococcus aureus*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais Espécies e subespécies do gênero <i>Staphylococcus</i> , segundo o perfil de produção de coagulase, nuclease e enterotoxinas.....	16
Quadro 2 - Características bioquímicas de espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	18
Quadro 3 - Fatores intrínsecos e extrínsecos interferentes na formação de enterotoxina por <i>S. aureus</i>	21
Quadro 4 - Enterotoxinas estafilocócicas e suas variantes e localização de seus genes codificadores em <i>S. aureus</i>	23
Quadro 5 - Informações acerca dos iniciadores (<i>primer</i>) utilizados na PCR para a amplificação de segmentos específicos dos genes <i>nuc</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i> nas cepas de SCP isoladas de leite cru refrigerado de 50 propriedades leiteiras do oeste do Paraná que compuseram o estudo.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de manejo e produção das 25 propriedades rurais do estudo que apresentaram contagem de SCP no leite.....	49
Tabela 2 - Contagem de SCP e <i>S. aureus</i> em leite cru refrigerado coletado em propriedades rurais de três municípios do Oeste do Paraná, presença dos genes de enterotoxina, sua produção <i>in vitro</i> e perfil de resistência aos antimicrobianos das 62 cepas de SCP isoladas no trabalho.....	50
Tabela 3 - Perfil enterotoxigênico das cepas de SCP isoladas de leite cru refrigerado em propriedades de municípios do oeste do Paraná, com relação à verificação da presença dos genes de enterotoxinas clássicas na PCR.....	52

SUMÁRIO

1	Introdução geral.....	12
2	Revisão de literatura.....	14
2.1	<i>Staphylococcus sp.</i>	15
2.1.1	Contagem em placa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e caracterização bioquímica e molecular.....	18
2.2	Enterotoxinas estafilocócicas.....	20
2.2.1	Localização dos genes	22
2.2.3	Sinais clínicos da intoxicação e mecanismo de ação das enterotoxinas	25
2.2.4	Métodos de detecção de enterotoxinas	27
2.3	Aspectos importantes sobre resistência aos antimicrobianos e formação de biofilme.....	29
2.4	Surtos de intoxicação estafilocócica.....	31
2.4.1	Formas de prevenção e controle	32
2.5	Referências	34
3	Objetivos.....	40
4	Capítulo I - Caracterização molecular, potencial enterotoxigênico e resistência a antimicrobianos de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em leite cru refrigerado.....	41
4.1	Introdução	41
4.2	Material e Métodos.....	43
4.2.1	Obtenção das amostras.....	43
4.2.2	Quantificação e caracterização das cepas	44
4.2.2.1	Extração do DNA.....	44
4.2.2.2	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	44
4.2.3	Verificação da produção de enterotoxinas <i>in vitro</i>	46
4.2.4	Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	46
4.3	Resultados	47
4.4	Discussão.....	52
4.5	Conclusões	55
5	Conclusões gerais	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

Algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, principalmente *Staphylococcus aureus*, são importantes patógenos causadores de surtos alimentares devido à sua capacidade de produção de enterotoxinas. No Brasil, *S. aureus* é o segundo maior causador de doenças veiculadas por alimentos, com notificação de cerca 854 surtos entre os anos de 2000 e 2015 (BRASIL, 2016). O leite e seus derivados estão frequentemente envolvidos em surtos causados por este patógeno (CARMO et al., 2002; EVENSON et al., 1988; FETSCH et al., 2014; SABIONI; HIROOKA; SOUZA, 1988). Em um levantamento realizado no Estado de São Paulo acerca de surtos alimentares envolvendo leite e derivados, *S. aureus* foi o principal agente bacteriano envolvido, em 23,9% dos surtos (MERUSSI; MAFFEI; CATANOZI, 2012).

A contaminação do leite por bactérias deste gênero pode ocorrer já em etapas iniciais de sua obtenção, como por ocasião da existência de vacas com mastite no rebanho ou por falhas higiênico-sanitárias no processo de ordenha (LEE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011; RALL et al., 2014). O processamento térmico na indústria, se realizado de forma correta, destrói os patógenos, inclusive *S. aureus*. Porém, quando o leite contendo este micro-organismo se encontra em temperaturas superiores a 7°C, poderá ocorrer a multiplicação e conseqüentemente elaboração de enterotoxinas. Isto pode ocasionar surtos alimentares, pois sendo termoestável, a toxina passa pelo processo térmico da indústria sem sofrer inativação (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Adicionalmente, o leite processado termicamente na indústria, pode sofrer contaminação por *Staphylococcus* sp. através dos manipuladores no momento da fabricação de derivados visto que faz parte da microbiota da pele e mucosas de um terço da população adulta (SALYERS e WHITT, 2002). Sendo assim, quando o derivado lácteo contendo uma espécie enterotoxigênica for submetido a temperaturas inadequadas por falhas de armazenamento, seja na indústria, no comércio ou no ambiente doméstico, existe o risco da produção de enterotoxinas (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Frente ao exposto, é de extrema importância conhecer a qualidade microbiológica do leite e estudar as características genotípicas e fenotípicas das

cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP) circulantes no ambiente da pecuária leiteira. Isto possibilita conhecer sua epidemiologia e suas características, permitindo que sejam adotadas medidas preventivas de contaminação a fim de reduzir a ocorrência de surtos por intoxicação estafilocócica. Adicionalmente, serve como monitoramento quanto às mudanças genéticas ocorridas ao longo do tempo entre cepas e que podem levar ao desenvolvimento de resistência a desinfetantes e antimicrobianos, bem como pode oferecer uma visão atualizada das condições de obtenção e conservação do leite, permitindo traçar estratégias de melhoria nesta área.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A obtenção de matéria prima de boa qualidade está diretamente relacionada à adoção de práticas adequadas de higiene durante todas as etapas que envolvem a ordenha, desde o uso de pré-*dipping* até a limpeza e desinfecção de ordenhadeiras e tanque de refrigeração (OLIVEIRA et al., 2011). Estes procedimentos gerais de boas práticas são, inclusive, previstos na Portaria 368 do MAPA (BRASIL, 1997), que estabelece a adoção geral de práticas na obtenção de matérias primas com o objetivo da prevenção da contaminação do alimento. Outros parâmetros de extrema importância referentes à qualidade do leite estão contidos na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011). Esta legislação estabelece diretrizes visando à melhoria na qualidade do leite, bem como define a identidade do leite tipo A, pasteurizado e cru refrigerado. A refrigeração do leite cru na propriedade e seu transporte ao laticínio têm fundamental importância em sua qualidade e por isso também são tópicos tratados nesta legislação. Resumidamente, o leite em tanque de expansão deve atender à temperatura máxima de 4°C em até três horas após a ordenha, e o de imersão à temperatura máxima de 7°C, no mesmo tempo, podendo permanecer por um período máximo de 48 horas na propriedade e o seu transporte até o laticínio devendo ser realizado em caminhão-tanque isotérmico.

Tais medidas, aliadas a um manejo nutricional e sanitário adequado dos animais, manejo da ordenha, limpeza e desinfecção correta de utensílios e equipamentos e treinamento e especialização da mão-de-obra são fundamentais para a obtenção de um leite com qualidade superior (BOZO; SILVA; OKANO, 2013; DO AMARAL et al., 2004; VALLIN et al., 2009).

Uma maneira de monitorar a qualidade do leite é realizar a contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS), como preconiza o Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, através da IN nº 62 (BRASIL, 2011). A CBT elevada sugere falhas de higienização e sanitização em etapas da ordenha ou transporte, ou problemas na refrigeração e armazenamento do leite, podendo ocasionar diminuição do tempo de prateleira dos produtos. Altas contagens de células somáticas podem sugerir falhas de manejo com alta prevalência de animais com mastite subclínica na propriedade. O aumento destes dois indicadores poderá impactar negativamente no rendimento da matéria prima na produção de

derivados (OLIVEIRA et al., 2000; SHANDAN; KILARA; SHAH, 2008). Além disso, leite com problemas de CBT e de CCS pode conter resíduos de antimicrobianos que poderá desencadear quadros de reações alérgicas nos consumidores, contribuir para a seleção de micro-organismos resistentes além de interferir na produção de derivados como fermentados (ALMEIDA et al., 2003; NERO et al., 2007).

Outro impacto negativo das mastites subclínicas é a permanência de *Staphylococcus* sp. no rebanho e, conseqüentemente, no leite de forma silenciosa. Estes micro-organismos, mais especificamente *S. aureus*, são os mais importantes causadores de mastite contagiosa nos rebanhos leiteiros e de mais difícil tratamento e controle devido à sua capacidade de formação de biofilme nos mais diversos ambientes e à ampla resistência aos antimicrobianos e a desinfetantes (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; MEIRA et al., 2012; PEIXOTO et al., 2015). Várias espécies deste gênero são patogênicas tanto para os animais quanto para humanos e se tornam um perigo constante, pois estão amplamente disseminadas nos rebanhos leiteiros. No que se refere ao perigo associado ao leite, existe a possibilidade da elaboração de enterotoxinas que poderão causar surtos alimentares (RALL et al., 2014; SÁ et al., 2004).

2.1 *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* está amplamente distribuído no mundo como comensal da pele e mucosas de animais e humanos. Compreende bactérias Gram positivas, de conformação esférica (cocos) e arrançadas em cachos. São catalase positiva, anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos (SILVA et al., 2013; TORTORA et al., 2012). Taxonomicamente pertence ao Reino Monera, Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Bacillales* e Família *Staphylococcaceae* (VOS et al., 2009).

Dentro do gênero *Staphylococcus* existe uma divisão entre as espécies de acordo com a capacidade de produção da enzima coagulase, sendo então enquadrados entre *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). As principais espécies do gênero estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Principais Espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus*, segundo seu perfil de produção de coagulase, nuclease e enterotoxinas.

Espécie	Coagulase	Nuclease	Enterotoxina
<i>S. aureus subsp</i>			
<i>Anaerobius</i>	+	TE	-
<i>Aureus</i>	+	TE	+
<i>S. intermedius</i>	+	TE	+
<i>S. hyicus</i>	(+)	TE	+
<i>S. delphini</i>	+	-	
<i>S. schleiferi subsp</i>			
<i>Coagulans</i>	+	TE	
<i>Schleiferi</i>	-	TE	
<i>S. caprae</i>	-	TL	+
<i>S. chromogens</i>	-	-F	+
<i>S. cohnii</i>	-	-	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+
<i>S. haemolyticus</i>	-	TL	+
<i>S. lentus</i>	-		+
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	+
<i>S. sciuri</i>	-		+
<i>S. simulans</i>	-	V	
<i>S. warneri</i>	-	TL	+
<i>S. xylosus</i>	-	-	+

(FONTE: JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005)

Nota: + = positivo; - = negativo; -F = negativo p/ fracamente positivo; (+) reação fraca; v = variável; TE = termoestável; TL = termolábil.

A coagulase livre é a enzima que catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina através da ativação da trombina, sendo considerada um fator de virulência nas espécies de SCP. Existe também a coagulase conhecida como “*clumping factor*”, porém trata-se de uma proteína ligada à célula estafilocócica, sem ação enzimática, que tem a capacidade de ligar-se diretamente ao fibrinogênio, transformando-o em fibrina insolúvel (FOSTER, 2002; MADIGAN et al., 2012).

No que concerne à vigilância sanitária e inspeção de alimentos, as espécies de SCP possuem maior relevância. Isto se deve ao fato de se serem os mais comumente envolvidos em surtos pela produção de enterotoxinas, sendo *S. aureus* o principal envolvido (SILVA et al., 2013). Porém, como pode ser observado no Quadro 2, algumas espécies de SCN têm potencial de produzir enterotoxinas e, portanto, não devem ser desconsideradas perante a investigação de surtos, mesmo tendo uma menor probabilidade de serem enterotoxigênicas.

Entre as bactérias patogênicas não formadoras de esporos, *S. aureus* é a mais resistente, conseguindo se multiplicar em faixas de pH que variam entre 4 e 10, e atividade de água (a_w) entre 0,83 e 0,99. Esta capacidade varia de acordo com os substratos e quantidade de oxigênio do alimento. Outras características importantes são a capacidade deste micro-organismo em reduzir o telurito e ser halotolerante, multiplicando-se com facilidade em concentrações de cloreto de sódio de até 20% (SCHELIN et al., 2011; SILVA et al., 2013). Possui capacidade de se multiplicar em temperaturas que variam de 7°C a 44°C, porém sua temperatura ótima de crescimento está na faixa de 30-40°C (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; SCHMITT; SCHULER-SCHMID; SCHMIDT-LORENZ, 1990; SILVA et al., 2013).

Quadro 2- Características bioquímicas de espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Prova	<i>Staphylococcus</i>				
	<i>aureus</i>				
	<i>ssp. Aureus</i>	<i>ssp. Anaerobius</i>	<i>intermedius</i>	<i>hyicus</i>	<i>delphini</i>
Coagulase	+	+	+	D	+
<i>Clumping Factor</i>	+	-	D	-	-
Catalase	+	-	+	+	+
VP	+	-	-	-	-
Utilização aeróbica do manitol	+	+	(D)	-	(+)
Fermentação do manitol	+	-	-	-	-
TNase	+	+	+	+	-
Hemólise	+	+	D	-	+

Fonte: adaptado de JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005 e KLOOS, 1990 .

+: 90% ou mais cepas positivo; -: nenhuma ou menos que 10% positivo; D: 11 a 89% positivo; (): reação retardada.

2.1.1 Contagem em placa de *Staphylococcus* coagulase positiva e caracterização bioquímica e molecular

A Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2003) que regulamenta os métodos analíticos para análise microbiológica em alimentos bem como o *Food and Drug Administration* (BENETT; LANCETTE; 2001) determinam que o protocolo para a contagem de SCP e *S. aureus* em alimentos seja realizado em Ágar Baird-Parker (BP). A amostra é inoculada por semeadura em superfície em placa de Petri contendo o ágar. O BP possui em sua composição alguns agentes seletivos como o telurito de potássio e o cloreto de lítio. O piruvato de sódio e a glicina têm a função de recuperar células injuriadas e favorecer a multiplicação de SCP. Estes possuem a capacidade de reduzir o telurito de potássio a telúrio metálico, formando colônias negras no ágar, após 48 horas de incubação a 37°C (Figura 1). A presença da gema de ovo no BP contribui para a caracterização da morfologia da colônia. Devido à ação da lecitinase produzida pelo micro-organismo, há a formação de um halo opaco

ao redor da colônia, decorrente do depósito de sais de cálcio e magnésio dos ácidos graxos liberados com a hidrólise da lecitina presente na gema. Também pode ser observado um halo translúcido ao redor do halo opaco. Isto porque há uma redução no tamanho da molécula da lipovitellina (lipoproteína) presente na gema, quando o micro-organismo a utiliza (BRASIL, 2003; CAVALLINI et al., 2005).



Figura 1- Ágar Baird-Parker contendo colônias típicas de *Staphylococcus aureus*. (Fonte: Arquivo pessoal).

Na contagem de SCP, selecionam-se colônias típicas de *S. aureus* e as atípicas, que são negras ou acinzentadas, sem halo ou com apenas um deles. Ambos os tipos de colônias são submetidos à prova da coagulase, catalase e coloração de Gram; e para confirmação de *S. aureus*, à prova da termonuclease. Para o resultado final, faz-se uma estimativa através da proporção entre as colônias contadas na placa e as colônias confirmadas como positivas nas provas fenotípicas (BRASIL, 2003; SILVA et al., 2013).

No Quadro 2 estão listadas as espécies de SCP e seus respectivos perfis bioquímicos. Para um resultado mais confiável, o correto seria que as cepas fossem identificadas por análises moleculares, pois, como pode ser observado no Quadro 2, *S. aureus* e *S. intermedius* possuem o mesmo perfil de coagulase e termonuclease. Porém, o fato é que *S. intermedius* também tem potencial enterotoxigênico (Quadro 1), não afetando o objetivo da quantificação de SCP em alimentos.

Existem outros meios de cultura que podem ser utilizados para contagem ou isolamento de *Staphylococcus* sp. Na microbiologia clínica, por exemplo, as colônias

de *Staphylococcus* sp. são diferenciadas de outros gêneros em ágar sangue através de sua morfologia e perfil de hemólise. Para confirmação da espécie faz-se uso do ágar sal-manitol que possibilita um crescimento seletivo (pela presença de 7,5% de NaCl) e diferencial (presença do manitol e do indicador vermelho de fenol) do micro-organismo. Também podem ser realizadas provas adicionais como catalase, Vogues-Proskauer e fermentação anaeróbia de açúcares (KONEMAN et al., 2001).

Uma das técnicas mais eficientes de confirmação de espécies de SCP é a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Como se trata de uma ferramenta molecular, buscando-se amplificar um ou mais segmentos de genes específicos, a interferência de variantes ambientais não é relevante como em técnicas convencionais, em que o micro-organismo pode não expressar características esperadas (MADIGAN et al., 2012).

Para a identificação do gênero *Staphylococcus* têm-se usado o sequenciamento de regiões específicas do 16S RNAr (LANGE et al., 2015; ONNI et al., 2010). Já para a identificação da espécie, existem alguns genes-alvo para amplificação na PCR. Os mais utilizados são o gene *nuc*, que codifica a enzima termonuclease e o *coa* que codifica a enzima coagulase (DA SILVA et al., 2003; RALL et al., 2014). Os genes *femA* e *femB* estão situados no operon *femAB*, sendo genes críticos para o metabolismo celular (*housekeeping genes*) por estarem envolvidos na síntese de peptideoglicanos da parede celular bacteriana. Tais genes são específicos da espécie *S. aureus*, embora alelos *femAB* similares na organização e na sequência já tenham sido identificados em *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (MOUSSALLEM; KURY; ACOSTA, 2007; TON-THAT; FAULL; SCHNEEWIND, 1997).

2.2 Enterotoxinas estafilocócicas

Micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são facilmente destruídos pela pasteurização ou cocção de alimentos, porém as enterotoxinas produzidas por ele são termoestáveis, suportando até mesmo tratamentos como a esterilização de alimentos de baixa acidez (SILVA et al., 2013).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são proteínas simples, de baixo peso molecular. Possuem como característica, serem pré-elaboradas, ou seja, o micro-

organismo geralmente a produzirá no alimento e não no indivíduo. Sua produção ocorre em uma ampla faixa de temperatura, pH, disponibilidade de O₂, concentração de NaCl e *a_w* (Quadro 3) e varia também, de acordo com a cepa (SCHELIN et al., 2011; SILVA et al., 2013).

Quadro 3 - Fatores intrínsecos e extrínsecos interferentes na formação de enterotoxina por *S. aureus*.

Fator	Produção ótima de SE	Produção limite de SE
Temperatura	34-40°C	10-46°C
pH	7-8	5-9,6
<i>a_w</i>	0,99	0,86 0,99
NaCl	0%	<12%
Oxigênio	aerobiose	aerobiose/anaerobiose

Fonte: adaptado de SCHELIN et al., 2011.

São conhecidos cinco tipos clássicos de enterotoxinas: SEA, SEB, SEC (1,2,3), SED e SEE. Posteriormente, novas SEs foram sendo descritas e atualmente se encontram listadas desta forma: SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET. Estas SEs compartilham características importantes: 1. Semelhança estrutural; 2. Resistência a aquecimento e à ação de proteases (pepsina e tripsina); 3. Atuação como superantígeno com ativação inespecífica de células T seguida de mediadores da inflamação; e 4. Indução de êmese em modelos primatas. Existem também as conhecidas SE-like, sendo assim denominadas por não apresentarem atividade emética em modelos primatas (SEL-I e SEQ-I) ou por ainda não terem sido testadas para tal (SEJ-I, SEK-I, SEM-I – SEP-I, SEU-I – SEV-I). A toxina descrita a princípio como SEF, que revelou ter propriedades físico-químicas semelhantes às SEs, posteriormente foi renomeada como TSST (*toxic shock syndrome toxin*) por não produzir êmese e por ser produzida *in vivo*, como em infecções, por exemplo. Esta toxina tem especial importância na rotina clínica por causar síndrome do choque tóxico (FDA, 2012; HU; NAKANE, 2014; SANTANA et al., 2010).

A produção de SE ocorre entre 10 e 46°C, sendo ótima entre 34 e 40°C (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; SCHELIN et al., 2011; SCHMITT; SCHULER-SCHMID; SCHMIDT-LORENZ, 1990). Quando o alimento é armazenado em baixas temperaturas, o risco de produção de enterotoxinas estafilocócicas é mínimo. A composição do alimento também influencia na elaboração de SE, por exemplo, a

presença de conservantes químicos parecem impedir a sua formação (MIN et al.; 2013).

Quanto à característica de estabilidade térmica, um estudo realizado verificou que para a inativação de 90 % da enterotoxina B testada (D_{value}) seria necessário uma temperatura de 98,9°C durante 68,9 min. Desta forma, os processos de pasteurização e esterilização do leite não têm a capacidade de desativar estes antígenos, portanto se já presentes no leite cru ainda terão a capacidade de causar surtos mesmo após o processamento (READ JR.; BRADSHAW, 1966).

2.2.1 Localização dos genes

Tanto a regulação da expressão gênica das SEs quanto a localização de seus genes diferem entre si. Os genes estruturais de grande parte das SEs estão associados a elementos genéticos móveis (EGM) tais como plasmídios, bacteriófagos, transposons ou ilhas de patogenicidade. No Quadro 4, pode ser observada a localização de cada gene de SE.

Os plasmídios são EGM que se multiplicam independente do cromossomo bacteriano e o seu conteúdo genético pode ser descartado da célula bacteriana sem maiores problemas, pois raramente contêm genes *housekeeping* (MADIGAN et al., 2012)

Bacteriófagos ou fagos são parasitas intracelulares obrigatórios que fazem uso dos recursos biossintéticos do hospedeiro para se multiplicar. No caso de bactérias, estes fagos geralmente são vírus. Quando estes fagos se encontram em estado de quiescência no hospedeiro, a maior parte de seus genes não é transcrita. Ou seja, o genoma do fago encontra-se em estado reprimido, sendo nesta fase denominado profago (MADIGAN et al., 2012). O profago se incorpora no material genético da célula e sempre que houver replicação do cromossomo bacteriano, seu material genético também será replicado, permanecendo latente na progênie bacteriana. Este tipo de EGM permite a transferência de material genético entre células bacterianas através do fenômeno de transdução, ou seja, ele pode incorporar em seu capsídeo fragmentos do DNA bacteriano e ao infectar outra célula poderá transferir estas novas informações (TORTORA et al., 2012).

Quadro 4 - Enterotoxinas estafilocócicas e suas variantes e a localização de seus genes codificadores em *S. aureus*.

Enterotoxina	Variante	Localização do gene
SEA		Profago
	SEA ₁	Profago
	SEA ₂	Profago
SEB		Cromossomo, SaPI e plasmídio
SEC		SaPI
	SEC ₁	SaPI
	SEC ₂	SaPI
	SEC ₃	SaPI
	SEC _{BOV}	SaPI
SED		Plasmídio (pIB485)
SEE		Profago
SEG		egc, cromossomo
SEH		transposon
SEI		egc, cromossomo
SEJ-I		Plasmídio (pIB485, pF5)
SEK-I		SaPI
	SEK-I ₂	Profago
SEL-I		SaPI
SEM-I		egc, cromossomo
SEN-I		egc, cromossomo
	SEN-I _v	egc
SEO-I		Egc, cromossomo
SEP-I		Profago (Sa3n)
SEQ-I		SaPI
SER		Plasmídio (pIB485, pF5)
SES		Plasmídio (pF5)
SET		Plasmídio (pF5)
SEU-I		egc, cromossomo
	SEU-I _v	egc
SEV-I		egc, cromossomo
SEX-I		Cromossomo

Fonte: adaptado de HU; NAKANE, 2014; SCHELIN et al., 2011.

Os transposons são um tipo de elemento transponível que têm a capacidade de se mover para diferentes sítios dentro da mesma molécula de DNA ou até entre moléculas de DNA diferentes. Estes EGM não são encontrados como moléculas

independentes, eles estão inseridos em outras moléculas de DNA, como cromossomos, plasmídios ou genomas virais (bacteriófagos). Quando transposons são inseridos em uma molécula de DNA provocam mutação (MADIGAN et al., 2012).

As ilhas de patogenicidade estão inseridas no cromossomo bacteriano e se constituem de amplos segmentos do DNA, participando muitas vezes dos processos de virulência do micro-organismo (MADIGAN et al., 2012). A ilha de patogenicidade com maior importância em *S. aureus* é a SaPI3, por conter o operon *egc* (*enterotoxin gene cluster*) que abriga um grupo de genes codificadores de SE (*seg*, *sei*, *sem-I*, *sen-I*, *seo-I*, *seu-I*) (JARRAUD et al., 2001a; JARRAUD et al., 2001b; THOMAS et al., 2006).

2.2.2 Regulação da expressão gênica

A expressão de *seb*, *sec* e *sed* é, em parte, regulada por *agr* (*accessory gene regulator*). O sistema regulatório Agr também controla a expressão de várias outras proteínas virulentas em *S. aureus*, além de ser um sistema de *quorum sensing*, que permite a *S. aureus* responder de acordo com a densidade celular do ambiente. O sistema Agr sofre influência de muitos outros reguladores transcricionais que irão inferir respostas de acordo com as condições ambientais e de estresse (SCHELIN et al., 2011).

A transcrição do gene *sea* está ligada, até certo ponto, ao “ciclo de vida” do profago codificador da SEA, havendo indícios de que pode haver o envolvimento de um segundo profago na indução de SEA. O gene *see*, bem como o *sea*, também é codificado por um profago, porém este é defeituoso, e sua expressão parece não ser afetada pelo crescimento bacteriano (SCHELIN et al., 2011).

A maioria das enterotoxinas não-clássicas parece não ser controlada pelo sistema Agr, existindo ainda dúvidas se elas seriam responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, visto que destas, somente SEH foi detectada em alimentos envolvidos em surtos (SCHELIN et al., 2011).

A transcrição dos genes das SEs ocorre em todas as etapas do crescimento bacteriano, porém a sua intensidade varia conforme o tipo de enterotoxina. Cada gene de SE possui um comportamento específico e parece exibir seu próprio padrão de expressão, independente das diferenças entre cepas. Em um estudo realizado

em 2009, os pesquisadores observaram a existência de quatro diferentes perfis de expressão de SE. O primeiro perfil foi composto por genes que parecem não sofrer impacto na expressão conforme a fase de crescimento (*sea*, *see*, *sej-l*, *sek-l*, *seq-l*, *sep-l*). No segundo perfil ficaram classificados os genes de SE pertencentes ao operon *egc* (*seg*, *sei*, *sem-l*, *sen-l*, *seo-l*, *seu-l*) sendo que no que concerne a eles, a quantidade de RNAm diminuiu após a fase exponencial. No terceiro perfil, composto de *seb*, *sec* e *seh*, RNAm sofreu uma acentuada indução durante a transição entre fase exponencial e estacionária de multiplicação. No quarto perfil (*sed*, *ser* e *sel-l*), os níveis de RNAm aumentaram moderadamente ao final da fase exponencial (DERZELLE et al., 2009).

2.2.3 Sinais clínicos da intoxicação e mecanismo de ação das enterotoxinas

Os sintomas ocorrem em média após duas a seis horas da ingestão da toxina tendo relatos de sintomas iniciados com menos de uma hora após a ingestão. Náuseas, vômitos, cólicas, prostração, pressão baixa, dor de cabeça e, eventualmente, febre baixa podem ocorrer. A recuperação ocorre em aproximadamente dois dias e complicações ou morte são raras (JABLONSKI; BOHACH, 1997; SILVA et al., 2013).

As SEs são consideradas superantígenos, pois induzem uma resposta exacerbada do sistema imunológico. Sua ação ocorre de forma distinta de um antígeno comum. Na apresentação de um antígeno, a célula apresentadora de antígeno (APC) o expõe ao receptor do linfócito T através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Isto estimulará o linfócito T a emitir sinais que atrairão mediadores inflamatórios para o local. No caso das enterotoxinas, não existe uma exposição do antígeno pela APC. A enterotoxina promove uma ligação externa entre o receptor do linfócito T e o MHC tipo II promovendo envio de sinais constantes para a formação de mediadores inflamatórios, que irão desencadear alteração no sistema gastrointestinal conferindo sintomas como diarreia e náuseas (DOYLE; BUCHANAN, 2013; SALYERS; WHITT, 2002). Além disso, o mecanismo da êmese ocorre via estímulo nervoso. Quando SE atinge, na mucosa, terminações nervosas dos neurônios sensoriais aferentes do nervo vago, este levará o estímulo até o centro do

vômito no sistema nervoso central. Devido à isto, ocorre retroperistalsia do estômago e do intestino, ocasionando o vômito (FRANCO; LANDGRAF, 1996; HU; NAKANE, 2014).

Na Figura 2 há a apresentação de um antígeno normal em comparação com a ação de um superantígeno (SE). SE possui especificidade para a região V do receptor da célula T (HU; NAKANE, 2014).

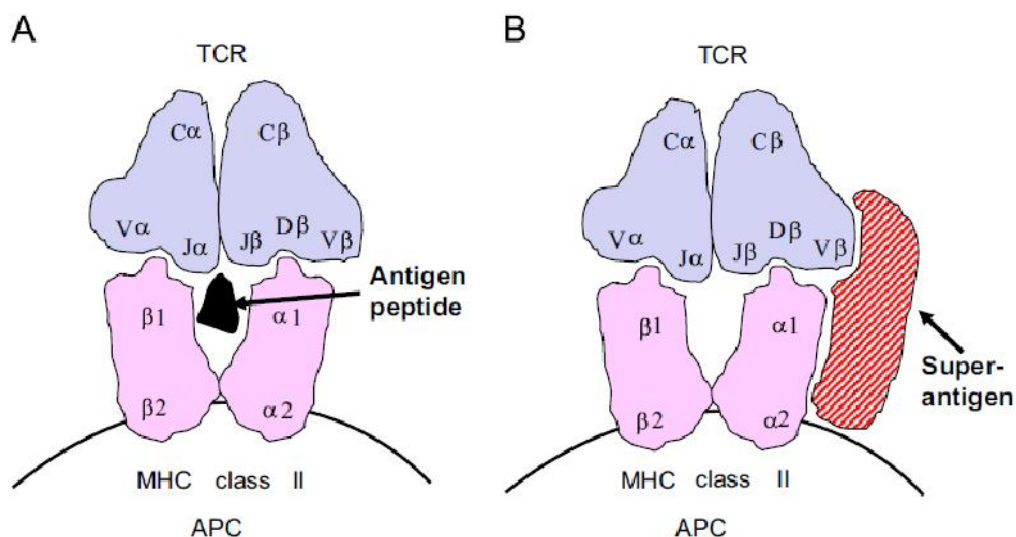


Figura 2 - Representação de um antígeno normal (A) e de um superantígeno ligando o receptor de célula T ao MHC de classe II da APC (B). Fonte: HU; NAKANE, 2014.

A ingestão de doses menores que 1 ng por grama de alimento contaminado pode provocar sintomas, porém não existe concordância entre os pesquisadores quanto à quantidade exata necessária para provocar sintomas. Estima-se que fique na faixa de 0,015 a 0,375 μg por quilo de peso corpóreo. Contudo, a ocorrência de surtos geralmente está relacionada à ingestão de 1-5 μg de enterotoxina (DOYLE; BUCHANAN, 2013; SILVA et al., 2013).

Divergências também ocorrem quanto à quantidade de células bacterianas do micro-organismo necessária para produzir determinada quantidade de enterotoxinas. O que é consenso é que a quantidade de SE dependerá, entre diversos fatores, do alimento ou meio de cultura em que se encontra (DOYLE; BUCHANAN, 2013).

Um estudo comparou a produção de SE em sanduíches e em um tipo de sushi coreano, em diferentes tempos/temperaturas. Quando mantido à temperatura de 20°C, o sushi coreano apresentou quantidades de SE de 1,0 ng/g no momento em que a população atingiu 8,47_{log10} UFC/g. Isto ocorreu após 70 h. Já no sanduíche, mantido à mesma temperatura, após 93 h, a contagem de *S. aureus*

ainda estava em $7,86_{\log_{10}}$ UFC/g e a quantidade de enterotoxinas detectada foi de 0,3 ng/g. Isto sugere que a matriz que compõe o alimento interfere no crescimento microbiano e, conseqüentemente, na produção de enterotoxinas. Os autores levantam a hipótese de que conservantes possivelmente adicionados ao pão do sanduíche teriam levado à inibição de *S. aureus* (MIN et al., 2013).

2.2.4 Métodos de detecção de enterotoxinas

Sabe-se que a ocorrência de surtos por intoxicação estafilocócica pode ser ocasionada pela presença de menos de 1µg de enterotoxina em 100g do alimento consumido (REISER; CONAWAY; BERGDOLL, 1974). Desta forma, é importante fazer uso de ferramentas de detecção altamente sensíveis quando na investigação de surtos suspeitos desta DVA (doença veiculada por alimento). A seguir, estão especificados os principais métodos utilizados para a detecção de enterotoxinas.

Bioensaio: as enterotoxinas podem ser detectadas bem como testadas quanto à sua capacidade de induzir êmese, em modelos experimentais. Por ser o modelo mais próximo do humano no que se refere a sensibilidade à enterotoxinas, os macacos rhesus (*Macaca mulatta*) são os mais indicados para este tipo de ensaio. Para o procedimento são selecionados animais jovens e a eles são administrados cerca de 50 mL do alimento homogeneizado diretamente no estômago, via sonda. Os animais são observados durante cinco horas. Um resultado positivo requer a ocorrência de êmese em pelo menos dois de seis animais. Neste modelo experimental, a ingestão de quantidades tão baixas quanto 5 µg de enterotoxina A ou B por Kg corporal já é capaz de induzir o vômito (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Imunodifusão: Na imunodifusão simples, acrescenta-se a amostra em um poço produzido em ágar ou agarose contendo o anticorpo complementar e verifica-se a presença da enterotoxina através da formação de um halo de precipitação ao redor do poço. Na imunodifusão dupla, a amostra e o anticorpo são depositados em poços adjacentes, sendo a presença da enterotoxina caracterizada por uma linha de precipitação entre os dois poços. A técnica OSP (*Optimum Sensitivity Plate*) é empregada para a pesquisa de cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* sp. É

executada distribuindo-se as amostras em poços preparados em placa de Petri contendo ágar Nobre. O antissoro é depositado em um poço no centro da placa e resultados positivos são observados a partir do desenvolvimento de linhas com precipitado (ROBBINS; GOULD; BERGDOLL, 1974). Estas técnicas têm a desvantagem de necessitar de um período relativamente alto de execução, dependendo da quantidade de antígeno na amostra, podendo levar de três a seis dias para a obtenção do resultado (FDA, 1991; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Uma alternativa mais rápida seria a imunodifusão dupla em microlâminas (em inglês *micro-slide double diffusion*), que é inclusive indicada e utilizada pela agência *Food and Drug Administration* como técnica padrão para o desenvolvimento de novos métodos e cujo resultado pode ocorrer em menos de oito horas se a lâmina for incubada a 45°C. Seu limite de detecção fica em torno de 30-60 ng/g (BENNETT; HAIT, 2011; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005)

Radioimunoensaio: Nesta técnica é utilizado um marcador radioativo ligado a um antígeno ou anticorpo que irá reagir com o anticorpo ou antígeno específico. A quantidade de conjugado antígeno-anticorpo na amostra é medida através de um medidor de radioatividade. Johnson et al. (1971) desenvolveram uma técnica de radioimunoensaio de fase sólida para detecção de enterotoxina estafilocócica que demonstrou ser de 5 a 20 vezes mais sensível do que a técnica de imunodifusão. O limite de detecção do teste evidenciou ser de 0,5-1,0 ng/g. Como desvantagem da técnica, há o fato de se requerer cuidados especiais durante a análise e com o descarte dos resíduos, por se tratar de material radioativo (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; JOHNSON et al., 1971; PIMENTA-MARTINS et al., 2013).

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*): Método imunológico no qual se emprega uma enzima (normalmente, a peroxidase,) acoplada ao anticorpo específico para o antígeno que se busca. No caso da detecção de enterotoxinas, os kits comerciais mais utilizados são os do tipo ELISA Sanduíche. Nesta técnica, os anticorpos anti-SE estão adsorvidos em placa de poliestireno, e as enterotoxinas presentes na amostra se ligam a eles. Esta reação é detectada pela interação do conjugado enzima-anticorpo com a adição do substrato cromogênico. O resultado é obtido através da leitura da absorbância das amostras em leitor de ELISA. Os kits comerciais disponíveis possuem apresentação no formato monovalente (para identificação de um tipo) ou polivalente (para *screening* de toxinas). O limite de detecção da técnica é de 1ng/g (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Aglutinação em látex (*Reverse Passive Latex Agglutination* - RPLA): Esta técnica é empregada através da marcação do anticorpo com partículas de látex. Com a reação de interação antígeno-anticorpo em caso de amostras positivas, há a formação de aglutinação. O limite de detecção é de 0,5 µg/g. Desta forma, esta é uma técnica mais segura que o radioimunoensaio, porém não tão sensível (FUJIKAWA; IGARASHI, 1988).

Western Blot: Esta técnica permite solubilizar e separar proteínas desnaturadas de diferentes tamanhos através do uso do dodecil sulfato de sódio em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sendo assim uma ótima opção para a pesquisa de enterotoxinas em amostras que passam por processos térmicos, como alimentos (PIMENTA-MARTINS et al., 2013; RASOOLY; RASOOLY, 1998).

Formas mais sensíveis e rápidas de detecção de enterotoxinas em alimentos aliadas a baixo custo devem ser buscadas, como é o caso do desenvolvimento imunossensores eletroquímicos. Estes consistem de dispositivos que convertem uma resposta biológica em um sinal elétrico e são uma alternativa promissora para o propósito (PIMENTA-MARTINS et al., 2013; WU et al., 2013).

Além disso, há a opção de se trabalhar com a ferramenta molecular PCR que possibilita a detecção de genes codificadores de enterotoxinas nas cepas isoladas ou até mesmo em alimentos, embora a detecção dos genes não permita afirmar que a cepa produziu enterotoxinas no alimento onde foi detectada. Adicionalmente, poderia se trabalhar com a detecção do RNAm, cuja presença indica a que a enterotoxina foi produzida.

2.3 Aspectos importantes sobre resistência aos antimicrobianos e formação de biofilme

A resistência a antimicrobianos ainda é um grande problema mundial e é importante entender os fatores que influenciam este comportamento nos micro-organismos. O uso indiscriminado de antimicrobianos não somente a nível hospitalar como no ambiente doméstico e na produção animal tem papel fundamental na influência desta resistência. Algumas bactérias, comumente comensais não-patogênicas, como *Enterococcus* sp. e *Escherichia coli*, tem participação crucial na manutenção e propagação da resistência à espécies patogênicas, sendo este fato

um grande risco. Isto já ocorre com muitos micro-organismos. Alguns são multirresistentes, sendo conhecidos como “super-bactérias”, pois sua infecção costuma não responder a administração da maioria dos antimicrobianos. Estão dentro deste grupo certas cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter* spp. carbapemenase positiva, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo. Para que um micro-organismo possa ser considerado multirresistente, ele deve apresentar resistência a no mínimo três classes de antimicrobianos (DOYLE; BUCHANAN, 2013; MAGIORAKOS et al., 2012).

Um fator que contribui para a permanência de cepas resistentes e propagação de genes de resistência nos mais diversos ambientes são os biofilmes. Biofilmes são comunidades de micro-organismos que se encontram aderidos a qualquer superfície, estando protegidos por uma espessa camada composta por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) contendo principalmente polissacarídeos e proteínas. Os micro-organismos estão depositados nas camadas mais internas desta matriz e sua comunicação com o meio externo para obtenção de nutrientes acontece por meio de canais formados nesta estrutura.

Os biofilmes são um grande problema na produção de alimentos, pois encontram nas superfícies de utensílios e equipamentos substrato em abundância para sua instalação. Por isso é imprescindível a correta limpeza e desinfecção destes materiais para que se evite a instalação do biofilme, pois quando instalados são de difícil remoção. Dentro desta “comunidade”, cepas de diferentes micro-organismos com diferentes perfis de resistência podem se comunicar e trocar material genético, desta forma propagando seus genes de resistência para cepas anteriormente suscetíveis (GUTIÉRREZ et al., 2012; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Os ambientes de produção, transporte e beneficiamento leiteiro estão sujeitos a instalação de biofilmes, inclusive de *S. aureus* e outros SCP. *S. aureus* tem potencial de aderência e produção do glicocálice (matriz de EPS) e como é um frequente causador de mastite sua presença está intimamente relacionada a estes ambientes (CASTELANI et al., 2015; FABRES-KLEIN et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2012). Aliando características de resistência a antimicrobianos e formação de biofilme ao potencial de elaboração de enterotoxinas, *S. aureus* demonstra-se um importante patógeno e seu controle na produção leiteira deve ser tratado com maior

apreço para que a ocorrência de surtos por intoxicação estafilocócica seja evitada, bem como a propagação de cepas multirresistentes.

2.4 Surtos de intoxicação estafilocócica

Algumas situações são frequentemente encontradas em surtos alimentares contribuindo para sua ocorrência. São elas: refrigeração inadequada dos alimentos; preparo dos alimentos com muita antecedência; manipuladores sem treinamento e/ou práticas de higiene adequadas, portando cepas enterotoxigênicas; aquecimento ou cozimento inadequado dos alimentos; e manutenção dos alimentos em dispositivos (como bufês) com funcionamento inadequado cuja temperatura permite a multiplicação microbiana (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Nota-se que a temperatura de armazenamento tem um papel crucial na ocorrência de surtos, podendo tanto influenciar negativamente como positivamente na multiplicação microbiana e consequentemente na produção de enterotoxinas estafilocócicas.

S. aureus é um dos mais importantes patógenos envolvido em surtos alimentares no mundo. No Brasil, *S. aureus* é o segundo maior causador de surtos, com notificação de cerca 854 surtos entre os anos de 2000 e 2015 (BRASIL, 2016). Como exemplo, em 1998, no Estado de Minas Gerais, ocorreu um grande surto de intoxicação estafilocócica envolvendo 4.000 indivíduos, inclusive com 16 casos de óbitos. A provável fonte de contaminação seriam as pessoas que estavam preparando os alimentos, pois foi constatado que elas eram portadoras de cepas de *S. aureus*, através de *swabs* nasais e das mãos. Algumas destas cepas eram enterotoxigênicas, possuindo genes codificadores de enterotoxinas. O que agravou a contaminação acidental foi o tempo prolongado de preparo associado armazenamento em temperaturas ambientes (DO CARMO et al., 2004).

Não se pode afirmar com certeza que exista um padrão de prevalência dos tipos de enterotoxinas envolvidas em surtos ou presentes em alimentos, porém são muitos os relatos do envolvimento da SEA nestas situações (ASAO et al., 2003; CHENG et al., 2016; DOYLE; BUCHANAN, 2013; EVENSON et al., 1988; KÉROUANTON et al., 2007; PEREIRA et al., 2009). Dados antigos relatavam que entre isolados de leite bovino a enterotoxina mais comumente encontrada era SEC, porém atualmente, com a popularização dos ensaios moleculares na pesquisa, os

relatos envolvendo enterotoxinas nestes isolados são os mais variados, existindo pesquisas que encontraram maiores frequências de SEA (RALL et al., 2014), SED (MORANDI et al., 2007), SEG (FREITAS et al., 2008; XU et al., 2015).

O leite e seus derivados estão constantemente implicados em surtos de intoxicações estafilocócicas. Wieneke e colaboradores (1993) realizaram um apanhado dos casos ocorridos no Reino Unido entre 1969 a 1990. Neste estudo foi constatado que em 8% dos casos os alimentos envolvidos eram leite ou derivados (WIENEKE; ROBERTS; GILBERT, 1993).

Embora grande parte dos surtos por SE seja possivelmente em decorrência de falhas de manipulação ou armazenamento, casos como o ocorrido no Japão envolvendo leite em pó, podem acontecer. Neste relato, 13.420 pessoas apresentaram sinais clínicos de intoxicação estafilocócica após ingestão de alimentos que levaram em sua formulação leite em pó processado em um laticínio do município de Osaka. Na investigação do caso, foi detectada a presença de enterotoxina A em quantidades que variaram de 3-7 ng/g do leite em pó desnatado (ASAO et al., 2003). Outro surto envolvendo SEA ocorreu após a ingestão de leite achocolatado em caixinha, por cerca de 850 alunos de uma escola, nos Estados Unidos. Os alunos apresentaram vômito e diarreia 3-4 horas após a ingestão da bebida (EVENSON et al., 1988).

Estes casos comprovam a importância da obtenção higiênica do leite e de sua conservação até o momento do processamento na indústria, impedindo, desta forma, a multiplicação de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e, conseqüentemente, a formação de enterotoxina.

2.4.1 Formas de prevenção e controle

O controle de SCP no campo inclui medidas higiênico-sanitárias comuns à maioria dos agentes. Tais como: o controle e tratamento da mastite contagiosa, de preferência lançando mão de ferramentas como análise microbiológica e antibiograma; a higienização adequada de equipamentos e utensílios como teteiras, tubulações, tanque de refrigeração e demais aparatos de ordenha; a adoção de práticas como pré e pós-*dipping* e desprezo dos três primeiros jatos antes da

ordenha; a manutenção adequada dos equipamentos de ordenha e refrigeração; e a capacitação dos funcionários e orientação quanto às noções de higienização tanto de utensílios e equipamentos como das mãos antes da ordenha. Também é importante evitar resíduos de leite nos utensílios e equipamentos para que não ocorra desenvolvimento de biofilmes em tais superfícies (BARI; OKUKO, 2016; VALLIN et al., 2009).

É imprescindível que o laticínio realize o transporte do leite da forma mais higiênica possível e com logística adequada, evitando percursos muito longos e consequentes oscilações exacerbadas de temperatura que irão possibilitar a multiplicação estafilocócica e produção de enterotoxina. Na recepção, o leite deve ser acondicionado em silos higienizados e refrigerados e o tempo entre chegada na plataforma e o processamento deve ser o menor possível. Para uma indústria de alimentos são medidas básicas a elaboração e implantação de manual de boas práticas de fabricação (BPF), implantação do sistema de análise de perigos de pontos críticos de controle (APPCC), processamento adequado da matéria-prima, cuidado rigoroso com a limpeza e sanitização, manutenção adequada dos equipamentos, treinamento de funcionários e estocagem correta dos alimentos prontos até o momento da expedição (ICMSF, 2005).

Quando os alimentos são produzidos com carga estafilocócica baixa, eles geralmente permanecerão seguros no que concerne à intoxicação por enterotoxinas se as condições de estocagem forem corretas (abaixo de 4°C ou acima de 60°C) até o momento do consumo (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

O transporte dos produtos até o varejo deve ser realizado em caminhões refrigerados evitando a oscilação de temperatura. Da mesma forma, no varejo e no ambiente doméstico a temperatura de estocagem é de extrema importância na conservação dos alimentos, na prevenção de produção de enterotoxinas e consequentemente de surtos (SHANDAN; KILARA; SHAH, 2008).

2.5 Referências

ALMEIDA, L. P. et al. Antibiotic residues in milk of rural properties of Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 3, p. 83–87, 2003.

ASAO, T. et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and infection**, v. 130, n. 1, p. 33–40, 2003.

BARI, M. L.; OKUKO, D. O. (EDS.). **Foodborne Pathogens and Food Safety**. Boca Raton: CRC Press, 2016.

BENNETT, R. W.; HAIT, J. M. Staphylococcal Enterotoxins Micro-slide Double Diffusion and ELISA-based Methods. In: **Bacteriological Analytical Manual**. [s.l.: s.n.].

BENNETT, REGINALD W.; LANCETTE, GAYLE A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. [s.l.] U.S. Food and Drug Administration, 2001.

BOZO, G. A.; SILVA, L. C.; OKANO, W. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 589–594, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 368, de 04/09/1997. **Regulamento técnico sobre condições higiênico-sanitárias e de BPF para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos**. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e Regulamento Técnico da Coleta do Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. 2011.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Portal da Saúde**. 2016.

CARMO, L. S. DO et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9–14, 2002.

CASTELANI, L. et al. Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 3, p. 340–344, 2015.

CAVALLINI, E. R. et al. **Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio**. [s.l.] Editorial Universidad de Costa Rica, 2005.

CHENG, J. et al. The Distribution of 18 Enterotoxin and Enterotoxin-Like Genes in *Staphylococcus aureus* Strains from Different Sources in East China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 4, p. 171–176, 2016.

DA SILVA, W. P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 125–127, 2003.

DERZELLE, S. et al. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 896–904, 2009.

DO AMARAL, L. A. et al. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 173–177, 2004.

DO CARMO, L. S. et al. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. **Foodborne pathogens and disease**, v. 1, n. 4, p. 241–246, 2004.

DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 4. ed. Washington, DC: ASM Press, 2013.

EVENSON, M. L. et al. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 311–316, 1988.

FABRES-KLEIN, M. H. et al. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 1–8, 2015.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 4, p. 1315–1320, 2004.

FDA. **BIOTECHNOLOGY INSPECTION GUIDE - REFERENCE MATERIALS AND TRAINING AIDS**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074181.htm#t>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

FETSCH, A. et al. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 1–6, 2014.

FOSTER, T. J. *Staphylococcus aureus*. In: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2002. p. 839–888.

FRANCO, B. G. D. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996.

FREITAS, M. F. L. DE et al. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 617–621, 2008.

FUJIKAWA, H.; IGARASHI, H. Rapid Latex Agglutination Test for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A to E that Uses High-Density Latex Particles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2345–2348, 1988.

GUTIÉRREZ, D. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8547–8554, 2012.

HU, D. L.; NAKANE, A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 722, n. 1, p. 95–107, 2014.

ICMSF (ED.). **International Commission on Microbiological Specification of Foods. Microorganisms in Food 6**. 2. ed. 2005.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. *Staphylococcus aureus*. In: **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 353–375.

JARRAUD, S. et al. egc, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 669–677, 2001a.

JARRAUD, S. et al. Correction. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4260, 2001b.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. New York: Springer, 2005.

JOHNSON, H. M. et al. Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. **Applied microbiology**, v. 22, n. 5, p. 837–41, 1971.

KÉROUANTON, A. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 369–375, 2007.

KLOOS, W. E. Systematics and the natural history of staphylococci. 1. **Journal of Applied Bacteriology**, v. Symposium, p. 25S–37S, 1990.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

LANGE, C. C. et al. Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 176, p. 382–388, 2015.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2003.

LEE, S. H. I. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 7377–7383, 2012.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed. San Francisco, CA: Pearson, 2012.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MEIRA, Q. G. DA SILVA et al. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 469–475, 2012.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. Consumo de laticínios no Estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 639–645, 2012.

MIN, K. et al. Effect of temperature on the production of staphylococcal enterotoxin and thermal inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* in selected ready-to-eat (RTE) foods in Korea. **Journal of Food Safety**, v. 33, p. 17–24, 2013.

MORANDI, S. et al. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66–72, 2007.

MOUSSALLEM, B. C.; KURY, C. M. H.; ACOSTA, E. M. Detecção dos genes *mecA* e *femA* , marcadores moleculares de resistência a metilicina , em *Staphylococcus* spp . isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da FMC**, v. 2, n. 2, p. 2–9, 2007.

NERO, L. A. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391–393, 2007.

OLIVEIRA, C. J. B. et al. Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiarid northeastern Brazil. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 6, p. 3166–3175, 2011.

OLIVEIRA, C. A. F. DE et al. Effect of microbiological characteristics of raw milk on the quality of whole milk powder. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 95–98, 2000.

ONNI, T. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 347–352, 2010.

PEIXOTO, M. M. R. et al. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 2, p. 105–109, 2015.

PEREIRA, V. et al. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278–282, 2009.

PIMENTA-MARTINS, M. G. R. et al. **Métodos de Análises Rápidas para a Detecção de Enterotoxinas Estafilocócicas em Alimentos**. 1. ed. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

RALL, V. L. M. et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 829–37, 2014.

RASOOLY, A.; RASOOLY, R. S. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 205–212, 1998.

READ JR., R. B.; BRADSHAW, J. G. Staphylococcal Enterotoxin B Thermal Inactivation in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 49, n. 2, p. 202–203, 1966.

REISER, R.; CONAWAY, D.; BERGDOLL, M. S. Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 83–85, 1974.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied microbiology**, v. 28, n. 6, p. 946–950, 1974.

SÁ, M. E. P. DE et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 321–326, 2004.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Rev. Saúde públ.**, v. 22, n. 5, p. 458–61, 1988.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis - A molecular approach**. 2. ed. Washington, DC: ASM Press, 2002.

SCHELIN, J. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 580–92, 2011.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 1–20, 1990.

SHANDAN, R. C.; KILARA, A.; SHAH, N. P. (EDS.). **Dairy Processing & Quality Assurance**. 1. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2008.

SILVA, N. et al. **Microbiological Examination Methods of Food and Water**. Londres: CRC Press, 2013.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573–583, maio 2010.

THOMAS, D. Y. et al. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4724–4734, 2006.

TON-THAT, H.; FAULL, K.; SCHNEEWIND, O. Anchor structure of staphylococcal surface proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 29143–29149, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VALLIN, V. M. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 181–188, 2009.

VOS, P. DE et al. (EDS.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 v.3. ed. New York: Springer, 2009.

WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. **Epidemiol. Infect.**, v. 110, n. 3, p. 519–531, 1993.

WU, L. et al. A novel electrochemical immunosensor based on magnetosomes for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. **Talanta**, v. 106, p. 360–366, 2013.

XU, J. et al. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. **Microbial Pathogenesis**, v. 88, p. 29–38, 2015.

3 OBJETIVOS

A presente pesquisa teve como objetivo geral avaliar o potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP) isoladas de leite cru refrigerado coletado em propriedades rurais de três municípios da região oeste do Paraná.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Realizar a identificação fenotípica das cepas de SCP;
- Identificar e caracterizar molecularmente as cepas de SCP isoladas para a espécie *Staphylococcus aureus* pela técnica da PCR, através da pesquisa do gene *nuc*;
- Identificar genes responsáveis pela produção de enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) entre os isolados de SCP;
- Verificar o potencial de produção de enterotoxinas em teste *in vitro* pelas cepas de SCP;
- Verificar o perfil de resistência das cepas de SCP a antimicrobianos.

4 CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM LEITE CRU REFRIGERADO

RESUMO: Espécies do gênero *Staphylococcus*, principalmente *Staphylococcus aureus*, estão frequentemente envolvidos em mastites e algumas têm potencial de produzir enterotoxinas termorresistentes nos alimentos, que causam intoxicações quando ingeridas. Além disso, estes micro-organismos adquirem e propagam com facilidade genes de resistência a antimicrobianos que os tornam de difícil controle no rebanho além de um problema de saúde pública. O objetivo do estudo foi verificar a frequência da presença de SCP em propriedades leiteiras do oeste do Paraná e conhecer o perfil das cepas circulantes no que concerne à presença de genes e elaboração de enterotoxinas, além da resistência antimicrobiana. Para isso, foram coletadas amostras de leite cru refrigerado em 50 propriedades de três municípios da região oeste do Paraná. As amostras foram submetidas à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, identificação molecular da espécie e de genes de enterotoxinas clássicas, bem como sua produção *in vitro*, além de teste de suscetibilidade a antimicrobianos. Das propriedades coletadas, 50% apresentaram amostras com contagens de SCP. Foram isoladas 62 cepas de SCP e deste total, 95,2% foram confirmadas *S. aureus* através da presença do gene *nuc*. Destas, 44,1% apresentaram ao menos um gene relacionado a produção de enterotoxinas clássicas. Apenas uma cepa produziu enterotoxinas. Todas as cepas foram resistentes a no mínimo um antimicrobiano. A maior resistência foi frente ao sulfametoxazol (96,8%), seguido da estreptomicina (80,6%), ciprofloxacina (50,0%), gentamicina (33,9%), ampicilina (32,3%), kanamicina (17,7%) e rifampicina (8,1%). Quatro propriedades que produziam queijo a partir do leite cru apresentaram cepas de SCP enterotoxigênicas, configurando um grande risco à saúde pública.

Palavras-Chave: antimicrobianos, enterotoxina, lácteos, PCR, *Staphylococcus aureus*

4.1 Introdução

O leite é um alimento rico em nutrientes, auxiliando na prevenção e tratamento de uma série de doenças, como a osteoporose, por exemplo (SGARBIERI, 2012). Tem fundamental importância principalmente na alimentação de crianças, sendo muitas vezes a fonte única de nutrientes nos primeiros meses de vida. Por ser um alimento amplamente consumido por pessoas de grupos de risco,

como crianças e idosos, medidas de controle sanitário e de obtenção higiênica do leite são de fundamental importância na prevenção de surtos decorrentes de seu consumo (FAO, 2013).

A quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) é de fundamental importância no monitoramento da inocuidade sanitária do leite e seus derivados. Este grupo contém espécies com potencial de produzir enterotoxinas, sendo *Staphylococcus aureus* a principal espécie envolvida. As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são peptídeos de baixo peso molecular que atuam no sistema imunológico como superantígenos, causando estímulo exacerbado e liberação excessiva de mediadores inflamatórios que desencadearão sinais clínicos como náuseas, vômito e diarreia (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

As enterotoxinas são classificadas em 11 tipos, sendo as clássicas SEA, SEB, SEC, SED e SEE, e as mais recentemente relatadas, SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET. As enterotoxinas estafilocócicas que não apresentaram atividade emética ou ainda não foram testadas são denominadas *staphylococcal enterotoxin-like* (SEL-I, SEQ-I, SEJ-I, SEK-I, SEM-I – SEP-I, SEU-I – SEV-I). Os genes que codificam estas enterotoxinas podem estar presentes no cromossomo bacteriano, porém a maioria está contida em elementos genéticos móveis como plasmídios, fagos e ilhas de patogenicidade (HU; NAKANE, 2014).

A permanência de SCP no ambiente de produção leiteira é preocupante frente a possibilidade da elaboração destas enterotoxinas no leite. Elas têm como característica principal a termorresistência, podendo ocasionar surtos de origem alimentar, mesmo após o processamento térmico do leite (ASAO et al., 2003; DOYLE; BUCHANAN, 2013; EVENSON et al., 1988; FETSCH et al., 2014). Em um levantamento realizado no Reino Unido entre 1969 e 1990, 8% dos surtos relacionados à ingestão de alimentos contaminados por enterotoxina estafilocócica foram em decorrência do consumo de leite ou derivados (WIENEKE; ROBERTS; GILBERT, 1993).

Um dos fatores que contribui para a presença de *S. aureus* no leite é a ocorrência de mastites que afeta frequentemente os rebanhos leiteiros. As mastites subclínicas são um problema ainda maior, pois muitas vezes passam despercebidas no momento da ordenha, sendo fonte de contaminação para o leite de conjunto. *Staphylococcus aureus* é um dos agentes que mais causa este tipo de problema em vacas leiteiras, levando ao desenvolvimento do quadro de mastite contagiosa (RALL

et al., 2014).

Outro aspecto relevante envolvendo *S. aureus* e mastite é o uso indiscriminado de antimicrobianos. Muitos trabalhos relatam a alta frequência de resistência de micro-organismos às mais variadas classes destes fármacos (KREAUSUKON et al., 2012; PEREIRA et al., 2009; WANG et al., 2015). A resistência aos antimicrobianos pode ser transferida entre cepas de forma vertical (de célula-mãe para célula-filha ou por mutação) ou horizontal (quando duas células trocam material genético, através de plasmídio, por exemplo) (ALA'ALDEEN; HIRAMATSU, 2004). Isto torna *S. aureus* um micro-organismo de difícil controle no rebanho, além de ser um problema de saúde pública.

Em vista do potencial de patogenicidade destes micro-organismos é muito importante manter um monitoramento nos rebanhos e adotar medidas de controle deste agente. Portanto, este trabalho teve como objetivo verificar a frequência da presença de SCP em propriedades leiteiras do oeste do Paraná e conhecer o perfil das cepas circulantes isoladas de leite cru refrigerado no que concerne à presença de gene e elaboração de enterotoxinas, além da resistência antimicrobiana.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Obtenção das amostras

No período de julho de 2014 a fevereiro de 2015, foram coletadas amostras de leite cru refrigerado de 50 propriedades rurais de três municípios do oeste do Paraná (Palotina, Nova Santa Rosa e Marechal Cândido Rondon). A escolha das propriedades foi realizada por conveniência, conforme o aceite dos produtores rurais. As amostras foram coletadas diretamente de tanques de expansão, imersão ou equipamento equivalente de refrigeração com o auxílio de concha e frasco estéril, sendo acondicionadas em caixa isotérmicas contendo gelo até o momento da análise em laboratório. Na ocasião da coleta, também foi realizado um levantamento objetivando conhecer o perfil das propriedades, verificando a quantidade em litros da produção leiteira diária e seu destino, uso de pré e pós-*dipping*, tipo de ordenha e de

refrigeração adotados no local.

4.2.2 Quantificação e caracterização das cepas

A contagem de SCP foi realizada em ágar Baird-Parker (DifcoTM, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA), conforme protocolo do BAM – *Bacteriological Analytical Manual* (BENNET; LANCETTE, 2001), sendo realizada a prova da coagulase para confirmação. Para isso foram selecionadas três colônias típicas e três atípicas das placas de BP. No total, 62 cepas confirmaram ser coagulase positiva. O resultado das contagens de SCP foi expresso em UFC/mL. As cepas SCP foram submetidas à coloração de Gram e a testes bioquímicos (catalase, crescimento e diferenciação em ágar sal-manitol, Voges-Proskauer e detecção da enzima termonuclease, fermentação do manitol em anaerobiose e hemólise em ágar sangue). As cepas foram mantidas congeladas a -20°C em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB - DifcoTM, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) com 10% de glicerol até o momento das análises moleculares.

4.2.2.1 Extração do DNA

As 62 cepas de SCP foram recuperadas transferindo-se uma alíquota do caldo estoque para tubos contendo caldo TSB, sendo incubadas a 37°C por 16-18 horas. A extração do DNA das cepas foi realizada seguindo-se o protocolo definido pelo kit comercial de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A quantidade do DNA extraído foi testada a partir da aferição de 1µL da amostra em espectrofotômetro NanoDrop LiteTM (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA).

4.2.2.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

O DNA das cepas foi submetido à seis PCR simples. A descrição dos

primers utilizados bem como o produto amplificado estão contidos no Quadro 5. O gene *nuc* foi pesquisado visando a caracterização para espécie *S. aureus*, e os demais genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) visando observar o perfil enterotoxigênico. Cada reação foi montada para um total de 25 µL e compreendeu 12,5 µL do GoTaq® *Green Master Mix* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 8,5 µL de água *Nuclease-Free* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1 µL de cada *primer* e 2 µL do DNA. O DNA foi amplificado com o auxílio do termociclador *Maxy Gene*™ (Axygen®, Corning, NY, EUA). A programação dos ciclos da reação variou conforme o *primer* utilizado, seguindo-se o protocolo de acordo com a referência com algumas adaptações, sendo adotado para *nuc*: 95°C por 2 min; 30 ciclos de 95°C por 30 s, 52°C por 30 s, e 72°C por 30 s; e uma extensão de 72°C por 2 min (SAZAKI et al; 2010); para *sea*, *seb* e *sec*: 94°C por 3 min; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 30 s, e 72°C por 30 s; e uma extensão de 72°C por 2 min (ROSEC e GIGAUD; 2002); e para *sed* e *see*: 94°C por 1 min; 35 ciclos de 94°C por 2 min, 55°C por 2 min, e 72°C por 1 min; e uma extensão de 72°C por 2 min (JOHNSON et al.,1991).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, numa corrente de 80 mA e voltagem de 100 V por um período de duas horas. Para possibilitar a visualização do produto amplificado, foi utilizado o corante intercalante GelRed™ 3X (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (ThermoScientific, Waltham, MA,EUA). A fotodocumentação foi realizada sob luz ultravioleta com o auxílio do transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, BRA).

As cepas de referência utilizadas como controle positivo das reações foram: ATCC 13.565 (*sea*); ATCC 14458 (*seb*); ATCC 19.095 (*sec*); ATCC 23.235 (*sed* e *nuc*); ATCC 27.664 (*see*).

Quadro 5- Informações acerca dos iniciadores (*primer*) utilizados na PCR para a amplificação de segmentos específicos dos genes *nuc*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* nas cepas de SCP isoladas de leite cru refrigerado de 50 propriedades leiteiras do oeste do Paraná que compuseram o estudo.

Gene	Sequência (5'-3') do primer	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>nuc</i>	TCG CTT GCT ATG ATT GTG G GCC AAT GTT CTA CCA TAG C	359	SASAKI et al., 2010
<i>sea</i>	GAATGATATTAATTTCGCATC TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	544	ROSEC; GIGAUD, 2002
<i>seb</i>	GAATGATATTAATTTCGCATC TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	416	ROSEC; GIGAUD, 2002
<i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCCA	257	ROSEC; GIGAUD, 2002
<i>sed</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317	JOHNSON et al., 1991
<i>see</i>	TAGATAAAGTTAAACAAGC TAACTTACCGTGGACCCTTC	170	JOHNSON et al., 1991

4.2.3 Verificação da produção de enterotoxinas *in vitro*

Para avaliar a produção de enterotoxinas, as 62 cepas de SCP foram testadas. Para isso, 150 µL da cultura estocada em BHI DifcoTM (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) com glicerol foram inoculados em 15 mL de caldo BHI suplementado com 1% de extrato de levedura, sendo incubado por 18 horas a 37°C. Para a realização do teste, foram seguidas as instruções apresentadas no manual do kit comercial utilizado, o Ridascreen[®] SET Total (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Este teste é um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e possibilita realizar uma triagem de cepas produtoras de enterotoxinas clássicas, porém não permite afirmar quais tipos de enterotoxinas a cepa produziu, somente se produziu ou não.

4.2.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade das 62 cepas de SCP aos antimicrobianos foi testada

utilizando-se a técnica *breakpoint* (KHACHATRYAN et al., 2004). O ágar Mueller Hinton (MH - Difco™, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) foi autoclavado, esfriado a 55°C e acrescido do antimicrobiano sendo vertido em placas de Petri de 100x15 mm para solidificação. As cepas foram reativadas em tubos contendo caldo TSB, em incubação a 37°C *overnight*. A partir disso, 20 µL das culturas foram transferidos para placa de 96 poços contendo 180 µL de caldo TSB estéril e incubados a 37°C *overnight*. As culturas então foram replicadas nas placas de MH com auxílio de um replicador de colônias (*pin replicator*) e incubadas a 37°C *overnight*. Os isolados foram classificados como resistentes quando apresentaram crescimento no ágar, e suscetíveis na ausência de crescimento. Para que o sucesso da transferência das colônias fosse assegurado, as mesmas foram inoculadas em ágar MH sem antimicrobiano. Foram testados nove antimicrobianos pertencentes a sete classes: (1) Aminoglicosídeos: estreptomicina (EST; 10 µg/mL), gentamicina (GEN; 10 µg/mL), kanamicina (KAN; 30 µg/mL); (2) Beta-lactâmico: Ampicilina (AMP; 10 µg/mL); (3) Quinolona: ciprofloxacina (CIP; 5 µg/mL); (4) Anfenicol: cloranfenicol (CLO; 30 µg/mL); (5) Sulfas: sulfametoxazol (SUL; 300 µg/mL); (6) Ansamicina: Rifampicina (RIF; 5 µg/mL); (7) Glicopeptídeo: Vancomicina (VAN; 30 µg/mL).

4.3 Resultados

A média de produção leiteira diária das 50 propriedades visitadas foi de 425 litros, sendo que a menor produzia 8 litros e a maior, 2.200 litros. A forma de refrigeração do leite na maioria das propriedades foi em tanque de expansão (70%), o de imersão foi encontrado em 20% e 10% faziam uso de geladeira para armazenar o leite, pois não entregavam para laticínio, faziam queijo colonial.

Das 50 propriedades que compuseram o estudo, 25 (50%) apresentaram amostras de leite coletado dos tanques com contagens de SCP. Na Tabela 1 estão dispostas as características de manejo e produção identificadas nestas propriedades e na Tabela 2, os resultados das contagens de SCP e *S. aureus*, presença de genes de enterotoxinas clássicas e sua produção *in vitro* e perfil de resistência aos antimicrobianos.

Foram isoladas 62 cepas de SCP. A partir dos resultados bioquímicos, 47 cepas (75,8%) confirmaram ser *S. aureus*. Já através da PCR do gene *nuc*, o total

de cepas confirmadas foi de 59 (95,2%). Destas, 26 (44,1%) apresentaram ao menos um gene relacionado à produção de enterotoxinas clássicas. Das três cepas negativas para o gene *nuc*, uma foi confirmada ser *S. delphini* pelos resultados bioquímicos e duas apresentaram resultados inconclusivos, sendo classificadas como *Staphylococcus* sp. Uma cepa de *Staphylococcus* sp. apresentou o gene *see*.

A frequência relativa de SCP enterotoxigênicos entre as cepas isoladas foi de 43,54%. Treze propriedades (26%) apresentaram amostras de leite contendo cepas de SCP enterotoxigênicas. A Tabela 3 contém o perfil enterotoxigênico das cepas de SCP isoladas no estudo.

Entre as propriedades que apresentaram cepas de SCP enterotoxigênicos (n=13), 46,1% faziam ordenha do tipo balde ao pé; 30,8%, manual; e 23,1%, ordenha do tipo circuito fechado. Quanto ao tipo de refrigeração,

O gene mais encontrado foi *see* (25,8%), seguido por *sec* (14,5%), *sea* (12,9%) e *sed* (1,61%). A presença de *seb* não foi detectada nos isolados. Na verificação da produção de enterotoxinas *in vitro*, uma cepa (1,6%) produziu enterotoxina, possuindo genes codificadores para três enterotoxinas (*sec*, *sed* e *see*).

Tabela 1 – Temperatura do leite no momento da coleta, produção de leite diária em litros, tipo de ordenha e de refrigeração encontrados nas 25 propriedades rurais de municípios de oeste do Paraná que apresentaram contagem de SCP no leite cru refrigerado.

Propriedade	Temperatura do leite (°C)	Produção diária (L)	Tipo de ordenha	Tipo de refrigeração
1	10	900	circuito fechado	expansão
2	8	2200	circuito fechado	expansão
3	1,7	275	balde ao pé	expansão
4	2,8	200	balde ao pé	expansão
5	10,5	1000	circuito fechado	expansão
6	7	50	balde ao pé	imersão
7	32,2	20	manual	imersão
8	7,3	300	balde ao pé	imersão
9	0,5	40	manual	geladeira
10	19,5	20	manual	geladeira
11	17	8	manual	geladeira
12	20,6	300	balde ao pé	expansão
13	17	180	balde ao pé	imersão
14	19,4	35	balde ao pé	geladeira
15	2,4	360	circuito fechado	expansão
16	4,8	650	circuito fechado	expansão
17	2,7	200	balde ao pé	expansão
18	5,9	335	balde ao pé	expansão
19	3,2	850	circuito fechado	expansão
20	5,4	315	circuito fechado	expansão
21	4	600	circuito fechado	expansão
22	1,8	1300	circuito fechado	expansão
23	6,8	130	balde ao pé	imersão
24	5	80	balde ao pé	expansão
25	17	25	balde ao pé	imersão

Nota: temperaturas em vermelho indicam desacordo com a IN nº62, que preconiza que a temperatura do leite refrigerado não exceda a temperatura de 4°C e 7°C em tanque de expansão e imersão, respectivamente.

Tabela 2 – Contagem de SCP e *S. aureus* em leite cru refrigerado coletado em propriedades rurais de três municípios do Oeste do Paraná, presença dos genes de enterotoxina, sua produção *in vitro* e perfil de resistência aos antimicrobianos das 62 cepas de SCP isoladas no trabalho.

Propriedade	Contagem de SCP (log UFC/mL)	Contagem de <i>S. aureus</i> (log UFC/mL)	Gene de enterotoxinas	Produção de enterotoxina	Perfil de resistência aos antimicrobianos*	Cepas de SCP isoladas (n=62)
1	2,05	<1,0	-	-	CIP-EST-GEN-SUL	01
2	1,48	1,48	-	-	CIP-EST-GEN-SUL	01
3	3,40	3,28	<i>sec, sed, see</i>	+	CIP-EST-SUL	01
			<i>see</i>	-	CIP-EST-GEN-SUL	01
			<i>see</i>	-	CIP-EST-GEN-SUL	01
			<i>see</i>	-	CIP-EST-SUL	01
4	3,20	3,20	<i>sec,</i>	-	CIP-SUL	01
			-	-	SUL	01
			<i>see</i>	-	SUL	01
5	2,54	2,54	<i>sea, sec</i>	-	CIP-EST-KAN-RIF-SUL	01
			<i>sea</i>	-	CIP-EST-SUL	01
			-	-	AMP-EST-KAN-SUL	01
6	3,78	3,78	<i>see</i>	-	CIP-EST-SUL	02
			-	-	EST-SUL	01
			<i>see</i>	-	EST-SUL	02
7	3,58	3,28	-	-	EST-SUL	01
			<i>sea, sec, see</i>	-	AMP-SUL	01
8	3,95	3,95	<i>see</i>	-	EST-SUL	01
9	3,93	3,93	-	-	AMP-CIP-EST-GEN-KAN-SUL	01
			<i>sec</i>	-	CIP-EST-GEN-KAN-SUL	01
			<i>sea,</i>	-	AMP-CIP-EST-GEN-KAN-SUL	01
			-	-	CIP-EST-GEN-KAN-SUL	01
			<i>sec</i>	-	EST-SUL	01
10	3,42	3,42	<i>sec</i>	-	EST-RIF-SUL	01

Continuação da Tabela 2

10			sea	-	CIP-EST-GEN-KAN-RIF-SUL	01
			-	-	CIP-EST-GEN-KAN-RIF-SUL	01
11	3,80	3,80	-	-	EST-GEN-KAN-SUL	01
			sea	-	CIP-KAN-SUL	01
12	3,31	3,31	-	-	CIP-EST-SUL	01
			-	-	SUL	01
13	4,54	4,54	-	-	SUL	01
			sea,	-	EST-SUL	01
			see	-	CIP-EST-SUL	01
			-	-	AMP-CIP-EST-SUL	02
14	4,93	4,93	-	-	AMP-CIP-EST-GEN-SUL	02
			sea, see	-	AMP-CIP-EST-GEN-SUL	01
			sea	-	AMP-CIP-EST-GEN-SUL	01
15	3,09	3,09	sec	-	EST-RIF-SUL	01
			sec	-	EST-SUL	01
16	3,10	3,10	-	-	SUL	01
17	2,83	2,83	-	-	EST-SUL	01
18	3,86	3,86	-	-	SUL	02
19	2,07	2,07	-	-	SUL	01
20	2,33	2,33	-	-	EST-SUL	01
			-	-	CIP-EST-GEN-SUL	01
21	2,00	2,00	-	-	AMP-EST	02
22	1,78	1,78	see	-	EST-SUL	01
23	4,31	4,31	-	-	AMP-EST-SUL	02
			-	-	AMP-EST-GEN-SUL	02
			-	-	AMP-EST-GEN-SUL	01
			-	-	AMP-CIP-EST-GEN-SUL	01
24	4,64	4,64	-	-	AMP-CIP-EST-GEN-KAN-SUL	01
			-	-	AMP-CIP-EST-SUL	01
25	3,37	3,37	-	-	CIP-SUL	01

AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; EST: estreptomicina; GEN: gentamicina; KAN: kanamicina; RIF: rifampicina; SUL:sulfametoxazol.*Cores diferentes indicam classes de antimicrobiano diferente.

Tabela 3 - Perfil enterotoxigênico das cepas de SCP isoladas de leite cru refrigerado em propriedades de municípios do oeste do Paraná, com relação à verificação da presença dos genes de enterotoxinas clássicas na PCR.

Gene (s) de enterotoxinas	Presença do gene
<i>sea</i>	05 (8,1%)
<i>sec</i>	06 (9,7%)
<i>see</i>	11 (17,7%)
<i>sea+sec</i>	01 (1,6 %)
<i>sea+see</i>	02 (3,2 %)
<i>sea+sec+see</i>	01 (1,6 %)
<i>sec+sed+see</i>	01 (1,6 %)
Total	27 (43,5 %)

Todas as cepas testadas foram resistentes a no mínimo um antimicrobiano, sendo que, o que mais apresentou resistência foi o sulfametoxazol (96,8%), seguido da estreptomicina (80,6%), ciprofloxacina (50,0%), gentamicina (33,9%), ampicilina (32,3%), kanamicina (17,7%) e rifampicina (8,1%). Todas as cepas foram suscetíveis ao cloranfenicol e à vancomicina.

Das amostras obtidas das 25 propriedades em que ocorreram contagens de SCP, todas apresentaram cepas resistentes a no mínimo um antimicrobiano testado. Apenas três (12%), apresentaram cepas resistentes a um antimicrobiano; seis (24%) a dois tipos; cinco (20%), a três tipos; cinco (20%) a quatro tipos; dois (8%) a cinco tipos; e quatro (16%) a seis tipos.

Vale destacar que em quatro propriedades (9, 10, 11 e 14) onde foram evidenciadas contagens de SCP no leite, detecção de cepas com genes de enterotoxina e um perfil variado de resistência aos antimicrobianos (Tabela 2), o leite de era destinado à fabricação de queijos coloniais sem nenhum tipo de fiscalização sanitária.

4.4 Discussão

No presente estudo foram detectadas amostras de SCP num elevado percentual de propriedades, sendo relevante também o número de cepas que apresentaram genes codificadores de enterotoxinas. Em um estudo na China,

70,64% das cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos e leite cru apresentaram um ou mais genes de SE. O estudo pesquisou genes de 18 enterotoxinas (CHENG et al., 2016). Já Srinivasan et al., (2006) reportaram que 93,6% das cepas oriundas de leite de vacas com mastite albergavam um ou mais genes de enterotoxina, sendo pesquisados 16 genes de SE. No presente estudo foram pesquisados os genes para enterotoxinas clássicas, sendo apenas cinco. Caso um número maior de genes de enterotoxina fosse pesquisado, certamente os percentuais de cepas enterotoxigênicas encontrados seriam ainda maiores.

Embora a presença do gene não indique necessariamente que o micro-organismo produzirá a enterotoxina, ela é um indicativo do potencial enterotoxigênico da cepa, que pode variar de acordo com as características do meio/alimento onde este se encontra (SCHELIN et al., 2011). Estudos relatam esta influência na formação de enterotoxinas (SIHTO et al., 2016; WU; SU, 2014). Valihrach e colaboradores (2013) observaram que a produção de SEC no leite é menor quando comparada à produção em caldo TSB. Mesmo que o leite contenha atividade inibitória frente à produção de SE, não há motivos para que se diminuam os cuidados em relação à presença de SCP no mesmo, pois existem relatos importantes de surtos por intoxicação estafilocócica envolvendo derivados lácteos, sendo que alguns aconteceram mesmo após o processamento do leite (ASAO et al., 2003; CARMO et al., 2002; EVENSON et al., 1988; FETSCH et al., 2014; WIENEKE; ROBERTS; GILBERT, 1993).

A frequência de cepas enterotoxigênicas que de fato produziram enterotoxina *in vitro* foi baixa (3,7%) quando comparado ao relatado por Morandi e colaboradores (2007) que foi de 51,8%, ou ao relato de Pereira e colaboradores (2009), onde observaram uma correlação de 80% entre a presença dos genes e a produção de enterotoxinas. Vale salientar que o método de detecção das enterotoxinas utilizados por estes autores foi o mesmo que o do presente estudo, sendo assim, as diferenças encontradas não podem ser atribuídas à metodologia do teste. São muitas as lacunas que envolvem a expressão e transcrição gênica e vários os fatores que as influenciam, além disso diferenças entre cepas de distintas regiões do mundo são compreensíveis pois, além de fatores ambientais interferentes em seu metabolismo, ainda há questões como mutações genéticas e deleção de genes dispensáveis ao micro-organismo que podem ficar restritas a cepas de grupos isolados. Estas explanações sugerem porque, no presente estudo, a produção de

enterotoxinas foi baixa quando comparada a outros relatos (MOTALLEBI et al., 2016; SNYDER; CHAMPNESS, 2007).

Na China (CHAO et al., 2015), cepas isoladas de leite cru apresentaram 17,6% de positividade para a presença do gene *sea*; 14,9% para *seb*; 4,0% para *sec*; 8,1% para *sed*; e 10,8 % para *see*. Contrariamente, no presente estudo o gene de SE mais frequente foi *see*, seguido por *sec*, *sea* e *sed*, sendo que o gene *seb* não esteve presente entre os isolados. Isto também sugere uma variação entre as cepas de cada região.

A presença de enterotoxinas em leite de um único tanque de refrigeração provavelmente não causará a ocorrência de surtos se este for diluído a quantidades maiores, livre de enterotoxinas. O risco existirá se uma partida de leite contaminado se configurar na única fonte de matéria prima de um laticínio ou no caso de propriedades que elaboram derivados artesanais, por exemplo. Mesmo assim, não se deve menosprezar a importância do controle destes micro-organismos no ambiente industrial visto que falhas no processamento do leite podem ocorrer possibilitando a aderência e formação de biofilme destes em tubulações por onde irá passar o leite já processado (TEH et al., 2015) .

Na avaliação da resistência aos antimicrobianos, as cepas isoladas apresentaram perfis diversificados, sendo que todas apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Sasidharan e colaboradores (2011) encontraram 6% de cepas pansuscetíveis aos antimicrobianos testados. A variação no perfil de suscetibilidade/resistência de cepas testadas em diferentes estudos é possivelmente decorrente de diferenças na terapia e profilaxia adotadas em infecções bacterianas de cada região. O perfil de resistência aos antimicrobianos neste estudo é explicado pelo uso indiscriminado dos mesmos na produção animal, não somente no tratamento de mastites, mas em afecções de uma maneira geral, muitas vezes até, sem envolvimento de agentes infecciosos. A possibilidade da existência de outros tipos de pecuária de criação na mesma propriedade também poderia influenciar na pressão de seleção de micro-organismos resistentes, pois principalmente em criações de aves e suínos o uso de antimicrobianos muitas vezes é utilizado como prevenção e profilaxia. Outra característica importante, relacionada ao gênero *Staphylococcus*, é a facilidade com que realizam a transferência de genes de resistência (MAGIORAKOS et al., 2012; SCHOENFELDER et al., 2016; SKÖLD, 2011).

O fato das cepas não apresentarem resistência à vancomicina neste estudo é um dado importante, pois este antimicrobiano é utilizado como última opção ao tratamento de infecções estafilocócicas que não respondem à antibioticoterapia usual e é restrito ao uso em humanos. Existe uma preocupação muito grande que cepas resistentes a este antimicrobiano, circulantes a nível nosocomial se disseminem para a comunidade e para a produção animal (SKÖLD, 2011).

Ainda tratando de assuntos relacionados à saúde pública, os dados referentes à elaboração de queijos artesanais por algumas propriedades evidenciados no presente estudo alertam para o risco oferecido aos consumidores destes produtos. Isto, devido à possibilidade da produção de enterotoxinas estafilocócicas nestes alimentos que pode ocasionar surtos além da propagação de cepas multirresistentes aos consumidores (GUIMARÃES et al., 2012; VIÇOSA et al., 2013).

4.5 Conclusões

O percentual de propriedades rurais que apresentaram presença de cepas de SCP com potencial enterotoxigênico foi considerado elevado, contudo somente uma cepa demonstrou capacidade de produção da enterotoxina *in vitro*. Também foi encontrada uma alta frequência de resistência aos antimicrobianos testados. Estes resultados devem servir de alerta para que sejam implantadas medidas sanitárias e de higiene dos tanques de estocagem bem como monitoramento das cepas circulantes.

A utilização do leite cru para a elaboração de queijos artesanais sem nenhum tipo de fiscalização oferece risco a saúde pública, devido à propagação de cepas multirresistentes e à presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas nas cepas isoladas, entre outros possíveis patógenos que não foram pesquisados.

Frente ao exposto, é de extrema importância a realização correta da higienização do tanque de resfriamento, bem como de todos os aparatos utilizados na ordenha e que terão contato com o leite. Outro ponto fundamental na prevenção de surtos por intoxicação estafilocócica é a conservação do leite cru, devendo ser respeitada a temperatura máxima de 4°C e o menor tempo de estocagem possível, não ultrapassando 48 horas. Finalmente, a manipulação do leite e de seus derivados

deve ser realizada cuidadosamente, visto que é comum encontrar pessoas portadoras de cepas de SCP enterotoxigênicas em sua microbiota cutânea e nasofaríngea.

ALA'ALDEEN, D.; HIRAMATSU, K. ***Staphylococcus aureus* - Molecular and Clinical Aspects**. Chichester, UK: Horwood Publishing Limited, 2004.

ASAO, T. et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and infection**, v. 130, n. 1, p. 33–40, 2003.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**. [s.l: s.n.].

CARMO, L. S. DO et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9–14, 2002.

CHAO, G. et al. Prevalence and diversity of enterotoxin genes with genetic background of *Staphylococcus aureus* isolates from different origins in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 142–7, 2015.

CHENG, J. et al. The Distribution of 18 Enterotoxin and Enterotoxin-Like Genes in *Staphylococcus aureus* Strains from Different Sources in East China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 4, p. 171–176, 2016.

DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 4. ed. Washington, DC: ASM Press, 2013.

EVENSON, M. L. et al. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 311–316, 1988.

FAO. **Food and Agriculture Organization. Milk and dairy products in human nutrition**. Rome: [s.n.].

FETSCH, A. et al. *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 1–6, 2014.

GUIMARÃES, A. G. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijo coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 259–265, 2012.

HU, D. L.; NAKANE, A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 722, n. 1, p. 95–107, 2014.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Staphylococcal Gastroenteritis. In: **Modern Food Microbiology**. 7. ed. [s.l.] Springer, 2005. p. 545–566.

JOHNSON, W. M. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426–430, 1991.

KREAUSUKON, K. et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4382–88, 2012.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MORANDI, S. et al. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66–72, 2007.

MOTALLEBI, M.; JABALAMELI, F.; ASADOLLAHI, K.; TAHERIKALANI, M.; EMANEINI, M. Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains with staphylococcal cassette chromosome mec type IIIA isolated from burn patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 34–37, 2016.

PEREIRA, V. et al. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278–282, 2009.

RALL, V. L. M. et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 829–37, 2014.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61–70, 2002.

SASAKI, T. et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SASIDHARAN, S.; PREMA, B.; YOGA, L. L. Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 130–2, 2011.

SCHELIN, J. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 580–92, 2011.

SCHOENFELDER, S. M. K.; DONG, Y.; FESSLE, A. T.; et al. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. **Veterinary Microbiology**, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811351630102X>>.

SGARBIERI, V. C. **Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de componentes do leite bovino**. São Paulo: Atheneu, 2012.

SIHTO, H.-M. et al. Growth behavior and temporal enterotoxin D expression of *Staphylococcus aureus* strains under glucose and lactic acid stress. **Food Control**, v. 62, p. 69–73, 2016.

SKÖLD, O. **Antibiotics and Antibiotic Resistance**. 1. ed. New Jersey: Wiley, 2011.

SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. **Molecular genetics of bacteria**. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.

SRINIVASAN, V. et al. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **Foodborne pathogens and disease**, v. 3, n. 3, p. 274–283, 2006.

TEH, K.H. et al. **Biofilms in the Dairy Industry**. New Jersey: Wiley Blackwell, 2015.

VALIHRACH, L.; ALIBAYOV, B.; DEMNEROVA, K. Production of staphylococcal enterotoxin C in milk. **International Dairy Journal**, v. 30, n. 2, p. 103–107, 2013.

VIÇOSA, G. N. et al. Egc characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates obtained from raw milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, p. 227–230, 2013.

WANG, D. et al. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p. 9–16, 2015.

WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. **Epidemiol. Infect.**, v. 110, n. 3, p. 519–531, 1993.

WU, X.; SU, Y. C. Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in pre-cooked tuna meat. **Food Control**, v. 42, p. 63–70, 2014.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas foi expressiva e preocupante entre as cepas de SCP isoladas bem como o perfil de resistência aos antimicrobianos. O armazenamento em condições de temperaturas inadequadas nos tanques de refrigeração das propriedades oferece risco aos consumidores de derivados lácteos frente a possibilidade da existência de enterotoxinas termorresistentes pré-elaboradas na matéria-prima. O uso do leite cru para elaboração de produtos lácteos artesanais contribui para a propagação de cepas multirresistentes além do desencadeamento de surtos por intoxicação estafilocócica.

Os antimicrobianos no tratamento de mastites, bem como das demais afecções devem ser utilizados de maneira mais responsável e ética. Sempre que possível, deve-se realizar análise de identificação e antibiograma do agente infeccioso envolvido para evitar o desenvolvimento de cepas multirresistentes no rebanho.

Os processos que compreendem desde as etapas iniciais de obtenção do leite até a disposição do produto final ao consumidor devem ser conduzidos considerando a adoção de medidas higiênico-sanitárias e de armazenamento e transporte em tempo/temperatura adequadas. Com isso, os riscos de ocorrência de surtos de origem alimentar serão minimizados.